DOI: 10.22092/VJ.2023.363788.2095
شماره ۱۴۳ تابستان ۱۴۰۳
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقاله کامل

بررسی اثرات دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) بر روی کیفیت اسپرم سگ در طول نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

• **منا اصحابی**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **علی سلیمان‌زاده (نویسنده مسئول)**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **اسماعیل آین**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۲۳-۰۷-۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۰۵-۱۰-۱۴۰۲
تاریخ بازنگری: ۰۴-۱۰- ۱۴۰۲ تاریخ انتشار: ۱۲-۰۴-۱۴۰۳
Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

کیفیت مایع منی سگ به طور قابل توجهی تحت تأثیر فرآیند ذخیره سازی است، زیرا غشای اسپرم بسیار حساس است. ذخیره سازی می تواند منجر به تولید رادیکال های آزاد شده و به غشای اسپرم آسیب برساند. مطالعه حاضر، با هدف کاهش اثرات مضر رادیکال های آزاد، و با افزودن غلظت های مختلف دوکوزاهگزانوئیک اسید به رقیق کننده مایع منی سگ و نگهداری آن در دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج روز انجام شد. در این مطالعه، ۲۵ انزال از سه سگ نژاد مخلوط جمع آوری شد و در یک رقیق کننده بر پایه تریس رقیق شدند. نمونه ها به ۵ گروه، کنترل (بدون آنتی اکسیدان) و ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر دوکوزاهگزانوئیک اسید در رقیق کننده تقسیم شدند. نمونه‌های مایع منی در ساعات ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰، پس از نگهداری در دمای یخچال از نظر جنبایی، مورفولوژی، آسیب DNA، زنده‌مانی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گروه های حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید افزایش قابل توجهی در درصد جنبایی، زنده مانی و آسیب DNA اسپرم و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام نسبت به گروه کنترل در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ نشان دادند. علاوه بر این، درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی در ساعت ۱۲۰ آزمایش، نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. در نتیجه، غنی‌سازی رقیق‌کننده مایع منی سگ با دوکوزاهگزانوئیک اسید تأثیر مثبتی بر کیفیت منی در طول نگهداری در شرایط دمای سرد دارد.

کلمات کلیدی: دوکوزاهگزانوئیک اسید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اسپرم، سگ

● Veterinary Researches & Biological Products No 143 pp: 53-61

Effect of Docosahexaenoic acid (DHA) on sperm quality of canine during liquid storage of semen at 5 °C

By: Ashabi, M., Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Soleimanzadeh, A., (Corresponding Author), Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. and Ayen, E., Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 2023-10-15 **Accepted: 2023-12-26**
Revised:2023-12-25 **Published: 2024-07-02**

Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

The storage process significantly affects the quality of a canine semen because the canine semen membrane is very sensitive to this process. In addition, this process leads to the production of free radicals which disturb the seminal membrane. The present study aimed to minimize the harmful effects of free oxygen radicals by adding different concentrations of docosahexaenoic acid to canine semen at 5 °C for five days. In this study, 25 ejaculates were collected from three mixed-breed canines and diluted in a Tris-based extender. They were then divided into 5 p groups: a control group (no antioxidants) and 1.25, 2.5, 5 and 10 ng/mL docosahexaenoic acid in the extender. The evaluations (motility, morphology, DNA integrity, viability, and total antioxidant capacity) were performed after 0, 24, 48, 72 ,and 120 hours of storage at cool temperatures using CASA software and a light microscope for sperm parameters and the ELISA method for the total amount of antioxidant capacity. The results showed that the groups containing docosahexaenoic acid had a significant increase in the percentage of cell viability, survival and total antioxidant capacity, as well as a significant increase in DNA integrity at 24, 48, 72 ,and 120 hours compared to the control group. While the proportion of sperm with normal morphology increased significantly after 120 hours compared to the control group. As a result, enrichment of canine semen diluent with docosahexaenoic acid shows a positive effect on its quality during storage in cold temperature conditions.

Keyword: *Docosahexaenoic acid; Antioxidant activity; Semen; Canine*

مقدمه

انجماد اسپرم یا نگهداری اسپرم و تلقیح مصنوعی دو فن اصلی در حوزه زیست‌فناوری هستند که در تولیدمثل حیوانات استفاده می‌شوند (۱، ۴). تلقیح مصنوعی روشی برای حفظ حیوانات با شایستگی ژنتیکی بالاتر است و در مقایسه با جفت‌گیری طبیعی مزایای مختلفی دارد (۱۹). با توجه به روند گسترش استفاده از تلقیح مصنوعی اسپرم در گونه‌های دامی مختلف، شناسایی روش‌ها و موادی که بتوانند اسپرم‌ها را با کیفیت بالا حفظ کنند، مورد توجه قرار گرفته است (۱۹). این موضوع باعث شده است که محققین بسیاری در این زمینه تحقیقاتی انجام داده و به دنبال راهکارهای مناسب برای بهبود کیفیت و نگهداری اسپرم باشند.

یکی از مشکلاتی که در نگهداری اسپرم وجود دارد، کاهش کیفیت اسپرماتوزوآ پس از فرایند نگهداری است (۲۰). این مشکل با تغییرات در کیفیت عملکرد و ساختار اسپرماتوزوآ قابل تشخیص است و باعث عدم باروری تخمک می‌شود (۲۷). علاوه بر این، یکی از عواملی که می‌تواند به کاهش باروری ناشی از تلقیح مصنوعی اسپرم‌های نگهداری شده منجر شود، تنش اکسیداتیو است (۲۸، ۱۶). این تنش ناشی از عدم توازن بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانی است. تحقیقات مختلف نشان داده است که سرد کردن و انجماد باعث ایجاد اثرات اکسیداتیو قوی در اسپرم می‌شود (۱۳). این اثرات شامل تولید گونه‌های اکسیژن فعال، پراکسیداسیون لیپیدی در غشاء اسپرم و تغییرات فیزیکی و شیمیایی در سلول‌های اسپرم است (۴۲، ۸). این تغییرات منجر به کاهش کیفیت اسپرم‌ها پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود (۲۳، ۲۲).

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط رقیق‌کننده منی به‌منظور حفاظت اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد و یخ‌گشایی بسیار مهم است (۴۱، ۳۶، ۲۱). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده می‌تواند عملکرد اسپرماتوزوآ را تقویت کند و اثرات مضر تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد در طول فرایند انجماد را کاهش دهد (۳۷، ۲۶). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نیز به‌عنوان محافظ‌های خوبی برای اسپرم منجمد و یخ‌گشایی شده عمل می‌کنند. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد

که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف به رقیق‌کننده مایع منی در طول نگهداری، می‌تواند منجر به بهبود قدرت زنده‌مانی و جنبایی اسپرم پس از فرایند نگهداری شود. نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها در این روند ممکن است متفاوت باشد (۳۵، ۳۹، ۳۰).

اسید چرب دوکوزاهگزانوئیک (DHA) یک اسید چرب ضروری است که جزو دسته‌ی امگا-۳ قرار می‌گیرد. اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳، اسیدهای چربی هستند که دارای پیوند دوگانه بین اتم‌های کربن ۳ و ۴ هستند. این دسته شامل اسیدهای چرب ضروری مانند اسید لینولنیک است که در بدن به ایکوزاپنتانویک (EPA) و دوکوزاهگزانویک (DHA) تبدیل می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف اسید چرب دوکوزاهگزانویک به‌صورت خوراکی در نریان، می‌تواند کیفیت مایع منی منجمد و یخ‌گشایی‌شده را تحت تأثیر قرار دهد (۳). همچنین، در مطالعه‌ای نشان داده شده است که اضافه کردن ۳ نانوگرم DHA به رقیق‌کننده (BioXcell) منی گاو در محیط آزمایشگاه می‌تواند منجر به بهبودی کیفیت مایع منی منجمد گاو شود (۱۵). این تحقیقات در گاو (۱۷) و گوزن (۷) انجام شده است.

تاکنون، تحقیقی درباره‌ی تأثیر اسید دوکوزاهگزانوئیک (DHA) بر نگهداری مایع منی سگ در دمای یخچال انجام نشده است. هدف اصلی از این مطالعه، بررسی اثرات محافظتی اسید دوکوزاهگزانوئیک بر روی مایع منی سگ در شرایط و دمای یخچال بود.

مواد و روش‌ها

نحوه جمع‌آوری منی

برای انجام این مطالعه، سه قلاده سگ نر نژاد مخلوط با سن حدود ۳-۵ سال انتخاب شدند و در بخش نگهداری سگ‌ها در دانشکده دامپزشکی نگهداری شدند. در طول مدت مطالعه، سگ‌ها با گوشت پخته تغذیه شده و آب به‌صورت آزاد در دسترس آن‌ها قرار گرفت. دوره عادت‌پذیری به مدت چهار هفته انجام شد و نمونه‌گیری به مدت ۶ هفته (در هر هفته، دو مرتبه) و به تعداد ۲۵ انزال (در طول ۶ هفته) انجام پذیرفت و برای از بین بردن تنوع دام‌ها بین نمونه‌ها، هر بار تمامی مایع منی انزالی سگ‌ها با یکدیگر ادغام گشتند. پس از اخذ نمونه‌های منی، آن‌ها به آزمایشگاه منتقل می‌شدند و بلافاصله مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. در ابتدا، نمونه‌ها از لحاظ ماکروسکوپی بررسی می‌شدند و پارامترهای ماکروسکوپی از جمله حجم و رنگ بررسی می‌شدند (۳۶).

برای انجام آزمایش، از نمونه‌های با غلظت بالای ۲۰۰×۱۰^{۶} استفاده شد. اسپرم‌ها با دور ۷۰۰ به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پلاسمای منی دور انداخته شدند (۱۹). سپس اسپرم‌ها در محلول رقیق‌کننده پایه شامل: ۲/۴ گرم تریس هیدروکسی متیل، ۱/۴ گرم اسید سیتریک، ۰/۸ گرم گلوکز، ۱۰۰۰۰۰ واحد بنزیل پنی‌سیلین، ۰/۱ گرم استرپتومایسین سولفات، ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ و ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر، برای دستیابی به غلظت مایع منی ۲۰۰ میلیون اسپرم در میلی لیتر، رقیق شدند (۳۵). سپس از این در گروه‌های آزمایشی مختلف استفاده شد. گروه‌بندی به‌صورت زیر انجام شد:

گروه اول (شاهد) با میزان ng/mL صفر دوکوزاهگزانوئیک اسید (Sigma; St. Louis, MO, USA)

گروه دوم با میزان ۱/۲۵ ng/mL دوکوزاهگزانوئیک اسید (حل شده در ۰/۰۵ درصد اتانول) (۲۳)

گروه سوم با میزان ۲/۵ ng/mL دوکوزاهگزانوئیک اسید

گروه چهارم با میزان ۵ ng/mL دوکوزاهگزانوئیک اسید

گروه پنجم با میزان ۱۰ ng/mL دوکوزاهگزانوئیک اسید (۱۵).

بلافاصله پس از جمع‌آوری، میزان جنبایی، قابلیت زنده‌مانی، مورفولوژی طبیعی، بررسی یکپارچگی DNA و میزان آنتی‌اکسیدان تام (TAC)، در ساعت‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی جنبایی اسپرم: برای تعیین درصد جنبایی اسپرم‌ها، یک قطره از محلول رقیق‌شده فوق روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و ۱۰ میدان دید میکروسکوپی با درشت‌نمایی ۴۰ برابر و با میکروسکوپ نوری (Tokyo, Japan ,Olympus, BX۴۱) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس میانگین اسپرم‌های با جنبایی کل در این ۱۰ میدان دید به‌عنوان درصد جنبایی ثبت شد (۳۴).

بررسی قابلیت زنده‌مانی و مورفولوژی طبیعی و غیرطبیعی اسپرم

برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و مرده و همچنین اسپرم‌های غیرطبیعی از لحاظ مورفولوژیکی، از رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین استفاده شد. اسپرم‌هایی که قطعات سر و گردن آن‌ها رنگ گرفته بودند، به‌عنوان اسپرم‌های مرده و آنهایی که رنگ نگرفته بودند به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند. همچنین، اسپرم‌هایی که دارای اختلالات مورفولوژیک بودند، به‌عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی در نظر گرفته شدند. برای هر نمونه، ۲۰۰ اسپرم با درشت نمایی ۴۰ برابر و با میکروسکوپ نوری (Tokyo, Japan ,Olympus, BX۴۱) مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج به‌صورت درصد اعلام شدند (۳۸).

ارزیابی آسیب DNA اسپرم

برای ارزیابی آسیب DNA اسپرم، از رنگ‌آمیزی با استفاده از آکریدین اورنج استفاده شد. پس از تهیه گسترش از نمونه‌ها و خشک شدن آن‌ها، لام‌ها به مدت ۲۴ ساعت توسط محلول کارنوی، ثابت شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج رنگ‌آمیزی شدند و سپس با شمارش ۳۰۰-۲۰۰ اسپرم در هر گسترش و با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت (Nikon Co., Tokyo, Japan ,Model GS۷)، درصد اسپرم های با DNA سالم (سبز رنگ) و DNA آسیب دیده (رنگ زرد تا نارنجی) بیان شد (۴۰).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های اسپرم با استفاده از کیت ارائه شده توسط شرکت نوند سلامت و طبق پروتکل این شرکت و با استفاده از روش الایزا انجام شد و نتایج به U/mL گزارش شدند (۲۷).

روش ارزیابی آماری

داده‌ها با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ با در نظر گرفتن زمان‌های ارزیابی، با رویه داده‌های تکرارشونده در زمان (Repeated measurement) و با آزمون تعقیبی Tukey-Kramer test مورد تجزیه و

تحلیل قرار گرفت. مدل آماری استفاده‌شده در این مطالعه $Yij = \mu + Ti + tj + eij$ بود (۳۲) که، Yij: مقدار فراسنجه اندازه‌گیری شده، μ: میانگین جامعه، Ti: اثر تیمار i ، tj اثر زمان ذخیره سازی و eij: خطای آزمایش بود. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵، بود.

نتایج

جنبایی کل اسپرم

در مورد گروه‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۱)، نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم‌ها درصد جنبایی در ساعت‌های بطور معنی‌داری کاهش می یابد(P<۰/۰۵). در بررسی در ساعت صفر بین گروه‌های درمانی، نشان داده شد که، درصد جنبایی در گروه‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۱) با غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ندارد (P<۰/۰۵). در ساعت ۲۴، تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و دوکوزاهگزانوئیک اسید با غلظت‌های ۱/۲۵ و ۱۰ نانوگرم (جدول ۱) وجود نداشت، اما گروه‌های ۲/۵ و ۵ نانوگرم دوکوزاهگزانوئیک اسید به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد، بودند (P<۰/۰۵، جدول ۱). در ساعت ۷۲، جنبایی در گروه‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۱) با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ نانوگرم به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته بود (P<۰/۰۵). همچنین، در ساعت ۱۲۰، گروه‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۱) با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ نانوگرم نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری در جنبایی نشان دادند (P<۰/۰۵). در آنالیز داخل‌گروهی، مشخص شد که در تمام گروه‌ها، درصد جنبایی در ساعت ۲۴ کمتر از زمان صفر و در ساعت ۷۲ کمتر از ساعت ۲۴ و در ساعت ۱۲۰ کمتر از ساعت ۷۲ است (P<۰/۰۵؛ جدول ۱).

زنده‌مانی اسپرم

تعداد اسپرم‌های زنده در ساعت صفر آزمایش (جدول ۲)، به‌طور معنی‌داری بیشتر از ساعت ۲۴، ساعت ۷۲ و ساعت ۱۲۰ بود (P<۰/۰۵). همچنین، بین ساعت‌های ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مورد میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۲)، در ساعت صفر، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش وجود نداشت (P<۰/۰۵). اما در گروه دوکوزاهگزانوئیک اسید، در ساعت‌های ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰، میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ نانوگرم نشان دادند (P<۰/۰۵). همچنین، در گروه دوکوزاهگزانوئیک اسید، در ساعت‌های ۷۲ و ۱۲۰، میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه ۵ نانوگرم نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ۱- مقایسه میانگین جنبایی اسپرم‌های سگ (Mean ± SEM) در گروه‌های مختلف درمانی دوکوزاهگزانوئیک اسید.

	ساعت‌های مورد آزمایش	شاهد	۱/۲۵ ng/mL	۲/۵ ng/mL	۵ ng/mL	۱۰ ng/mL
(٪) جنبایی	صفر ساعت	۷۱/۷۲ ± ۱/۴۷#	۷۱/۳۹ ± ۱/۰۸#	۷۱/۸۵ ± ۱/۱۶#	۷۲/۶۳ ± ۱/۱۲#	a۷۱/۰۵ ± ۱/۱۲#
	۲۴ساعت	۵۱/۱۹ ± ۱/۳۴ bψ	۵۲/۶۴ ± ۱/۲۹ aψ	۶۰/۸۱ ± ۱/۲۵ bψ	۶۶/۰۷ ±۱/۶۷ cψ	۵۳/۸۹ ±۱/۶۷ aψ
	۷۲ساعت	۲۵/۳۰ ± ۱/۷۴ aφ	۲۷/۰۶ ± ۱/۵۷ aφ	۳۵/۴۹ ±۱/۳۷ bφ	۳۸/۱۰ ±۱/۳۰ bφ	۲۷/۷۴ ±۱/۳۰ aφ
	۱۲۰ساعت	۴/۰۷ ± ۱/۱۴ aϒ	۴/۳۹ ± ۱/۲۰ aϒ	۱۱/۷۰ ±۱/۶۰ bϒ	۱۸/۲۲ ±۱/۳۴ cϒ	۴/۲۶ ±۱/۳۴ aϒ

*حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

*اشکال مختلف (ψ, φ, ϒ ,#) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

جدول ۲- مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم‌های سگ (Mean ± SEM) در گروه‌های مختلف درمانی دوکوزاهگزانوئیک اسید.

	ساعت‌های مورد آزمایش	شاهد	۱/۲۵ ng/mL	۲/۵ ng/mL	۵ ng/mL	۱۰ ng/mL
(٪) جنبایی	صفر ساعت	۷۶/۳۴ ± ۱/۲۳#	۷۶/۲۸ ± ۱/۸۷#	۷۷/۵۹ ± ۱/۴۵#	۷۸/۱۰ ± ۱/۲۰#	۷۶/۱۹ ± ۱/۱۲#
	۲۴ساعت	۶۵/۱۸ ±۱/۰۵ aψ	۶۷/۳۴± ۱/۶۴ aψ	۷۱/۷۹ ±۱/۳۸ bψ	۷۳/۴۸ ±۱/۴۸ bψ	۶۶/۲۵ ±۱/۶۷ aψ
	۷۲ساعت	۵۱/۳۲±۱/۳۶ aφ	۵۲/۸۹ ± ۱/۳۳	۵۶/۶۳ ±۱/۸۴ bφ	۶۱/۷۰ ±۱/۲۷ cφ	۵۲/۹۳ ±۱/۳۰ aφ
	۱۲۰ساعت	۳۵/۱۰ ± ۱/۳۰ aϒ	۳۶/۲۴± ۱/۶۹ aϒ	۳۹/۲۷ ±۱/۰۴ bϒ	۴۳/۶۱ ±۱/۵۵ cϒ	۳۵/۷۱ ±۱/۳۴ aϒ

*حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

*اشکال مختلف (ψ, φ, ϒ ,#) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

مورفولوژی طبیعی و غیرطبیعی اسپرم

در گروه‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۳)، تفاوت معنی‌داری در میزان مورفولوژی طبیعی و غیرطبیعی (که بیشتر شامل دم خمیده، سر جدا شده و دم مارپیچ شده بودند) بین گروه شاهد و تمامی غلظت‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید در ساعت‌های صفر، ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ مشاهده نشد (P<۰/۰۵). اما در ساعت ۱۲۰ آزمایش، میزان مورفولوژی طبیعی در گروه‌های حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۳) نسبت به ساعت‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

بررسی درصد آسیب DNA اسپرم

زمان آزمایش و برهم‌کنش با گروه‌های درمانی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) با میزان یکپارچگی DNA اسپرم مرتبط بود. میزان یکپارچگی DNA در گروه‌های تحت درمان دوکوزاهگزانوئیک اسید در ساعت ۷۲ و ساعت ۱۲۰ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کمتر از ساعت صفر و ۲۴ بود (جدول ۴). همچنین، بین ساعت‌های صفر و ۲۴ آزمایش (جدول ۴-۴)، درصد یکپارچگی DNA اسپرم‌ها بین گروه‌های آزمایش تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود نداشت. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که، در ساعت ۷۲ و ۱۲۰ آزمایش مشاهده شد که درصد یکپارچگی DNA در گروه ۵ نانوگرم دوکوزاهگزانوئیک اسید، به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵؛ جدول ۴).

جدول ۳- مقایسه درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم‌های سگ (Mean ± SEM) در گروه‌های مختلف درمانی دوکوزاهگزانوئیک اسید.

	ساعت‌های مورد آزمایش	شاهد	۱/۲۵ ng/mL	۲/۵ ng/mL	۵ ng/mL	۱۰ ng/mL
مورفولوژی طبیعی (٪)	صفر ساعت	۹۵/۰۱ ± ۱/۴۹ #	۹۴/۲۸ ± ۱/۶۳ #	۹۵/۳۹ ± ۱/۰۸ #	۹۶/۱۱ ± ۱/۴۰ #	۹۵/۴۷ ± ۱/۱۲ #
	۲۴ساعت	۹۴/۲۷ ± ۱/۴۹ #a	**۹۴/۴۱ ± ۱/۶۳** a#	**۹۵/۳۳ ± ۱/۰۸** a#	۹۸/۷۹ ± ۱/۴۰ b#	**۹۵/۱۲ ± ۱/۱۲** a#
	۷۲ساعت	۹۲/۳۴ ± ۱/۴۴ a#	۹۲/۵۵± ۱/۵۹ a#	**۹۳/۲۶ ± ۱/۶۴** a#	۹۳/۲۰ ± ۱/۲۴ a#	۹۲/۴۱ ±۱/۶۷ b#
	۱۲۰ساعت	۸۵/۱۱±۱/۲۸ aψ	**۸۵/۶۳ ± ۱/۴۱** aψ	۸۵/۹۰ ±۱/۲۲ aψ	۸۶/۴۸ ±۱/۷۲ aψ	۸۵/۷۹ ±۱/۳۰ aψ

*حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

*اشکال مختلف (ψ ,#) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد یکپارچگی DNA اسپرم‌های(Mean ± SEM) سگ در گروه‌های مختلف درمانی دوکوزاهگزانوئیک اسید.

	ساعت‌های مورد آزمایش	شاهد	۱/۲۵ ng/mL	۲/۵ ng/mL	۵ ng/mL	۱۰ ng/mL
یکپارچگی DNA(٪)	صفر ساعت	۹۸/۴۶ ± ۱/۳۹#	۹۸/۲۱ ± ۱/۰۹ #	۹۸/۵۴ ± ۱/۶۸ #	۹۸/۳۵ ± ۱/۱۲ #	۹۸/۵۱ ± ۱/۵۴ #
	۲۴ساعت	۹۵/۶۸ ± ۱/۲۶#a	۹۵/۲۹± ۱/۴۴ a#	۹۶/۱۳ ± ۱/۱۶ a#	۹۶/۵۸ ± ۱/۱۲ a#	۹۶/۰۲ ±۱/۸۱ a#
	۷۲ساعت	۸۷/۰۱±۱/۸۳ aψ	۸۷/۲۹ ± ۱/۱۹ aψ	۸۸/۶۹ ±۱/۳۰ aψ	۹۲/۲۴ ±۱/۶۷ b#	۸۶/۵۴±۱/۲۷ aψ
	۱۲۰ساعت	۷۵/۱۹ ±۱/۶۷ aφ	۷۵/۳۱± ۱/۴۴ aφ	۷۹/۱۶ ±۱/۸۳ bφ	۸۴/۵۰ ±۱/۳۰ cψ	۷۵/۸۰±۰/۸۷ aφ

*حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

*اشکال مختلف (ψ, φ ,#) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

بررسی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی

زمان آزمایش، گروه‌های درمانی و برهم‌کنش بین زمان آزمایش با گروه‌های درمانی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پلاسمای منی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) مرتبط بودند (جدول ۵). در گروه‌های دوکوزاهگزانوئیک اسید، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمان صفر نسبت به ساعت ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بود (جدول ۵). همچنین، در گروه‌های ۲/۵ و ۵ نانوگرم دوکوزاهگزانوئیک اسید (جدول ۵)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ساعت‌های ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از گروه شاهد بود.

بحث

در این مطالعه، تأثیر دوکوزاهگزانوئیک اسید بر روی پارامترهای مختلف، از جمله درصد جنبایی، زنده‌مانی، مورفولوژی طبیعی، میزان یکپارچگی DNA و میزان قدرت تام آنتی‌اکسیدانی در منی سگ در طول نگهداری در دمای پایین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که نمونه‌های اسپرم حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید به‌طور قابل‌توجهی فراسنجه‌های کیفی اسپرم سگ را بعد از فرایند نگهداری در یخچال بهبود می‌بخشد. نتایج این مطالعه با مطالعه قبلی که افزودن ویتامین E و کاتالاز به رقیق‌کننده منی سگ را بررسی کرده‌اند، مشابه است. این مطالعه نشان داده‌اند که با افزودن ویتامین E و کاتالاز به رقیق‌کننده منی سگ، کیفیت و پارامترهای منی در طول نگهداری بهبود یافته است (۲۲). علاوه براین، در مطالعه دیگر نشان داده شده است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند با کاهش معنی‌دار رادیکال‌های آزاد، منجر به بهبود کیفیت منی سگ در طول نگهداری آن در دمای یخچال شود (۱۰). به‌منظور ارزیابی کیفیت مایع منی، ارزیابی جنبایی اسپرم به‌عنوان یک معیار مهم مورد توجه قرار می‌گیرد. بر اساس تحقیقاتی که توسط Saito و همکاران (۱۹۹۶) انجام شده است (۳۱)، در نمونه‌های طبیعی اسپرم سگ باید جنبایی اسپرم حداقل ۷۰ درصد باشد. کاهش جنبایی اسپرم پس از سرد شدن و دوباره گرم شدن می‌تواند به دلیل حساسیت دمایی پمپ پتاسیم-سدیم مرتبط با ATPase و نفوذ یون‌ها باشد که باعث افزایش هیدروژن‌پراکسیداز و پراکسیداسیون لیپیدی در لایه پلاسما سلول می‌شود. این افزایش پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش نفوذپذیری سلول شده و در نهایت به کاهش جنبایی و زنده‌مانی اسپرم منجر می‌شود (۲). با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها که فعالیت رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهند، ممکن است این مشکل بهبود یابد (۵). در تحقیق حاضر نشان داده شد که غنی‌سازی منی سگ با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ نانوگرم دوکوزاهگزانوئیک اسید در طول نگهداری در دمای پایین، باعث افزایش جنبایی اسپرم نسبت به گروه شاهد می‌شود. این نتایج با گزارش‌ها قبلی که نشان داده‌اند افزودن دوکوزاهگزانوئیک اسید به منی گوزن می‌تواند جنبایی اسپرم‌ها را پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی بهبود دهد (۱۴). همچنین، در یک تحقیق دیگر توسط Kaka و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده شد که غلظت ۳ نانوگرم دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند پارامترهای منی گاو را نسبت به گروه شاهد بهبود دهد (۱۵). در تحقیق Losano و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان داده شده است که غلظت‌های مختلف دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر عملکرد اسپرم‌های گاو داشته باشد. غلظت‌های بالا (۱۰ میکرومولار) می‌توانند منجر به کاهش جنبایی اسپرم و غلظت‌های پایین‌تر (۳ میکرومولار) نیز می‌توانند جنبایی اسپرم گاو را پس از فرایند انجماد بهبود بخشند (۲۰). در مطالعه حاضر نشان داده شد که دو دوز به ترتیب ۵ و ۲/۵ نانوگرم توانست باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد در ساعت‌های ۷۲ و ۱۲۰ گردد. این مطالعه مؤید مطالعات قبلی است که نشان دادند که استفاده از دوکوزاهگزانوئیک اسید در اسپرم گاو می‌تواند سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرایند یخ‌گشایی شود (۱۵). همچنین، در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که نگهداری منی خرگوش در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد تا ۷۲ ساعت منجر به افزایش قابل توجهی از رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید می‌شود و در نهایت باعث کاهش کیفیت منی خرگوش می‌شود (۳۳). این کاهش زنده‌مانی ممکن است به دلیل حضور و افزایش رادیکال‌های آزاد باشد. تنش اکسیداتیو به معنای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، منجر به آسیب سلولی و اختلال در

جدول (۵)- مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم‌های(Mean ± SEM) سگ در گروه‌های مختلف درمانی دوکوزاهگزانوئیک اسید.

	ساعت‌های مورد آزمایش	شاهد	۱/۲۵ ng/mL	۲/۵ ng/mL	۵ ng/mL	۱۰ ng/mL
فعالیت (٪)آنتی‌اکسیدانی	صفر ساعت	۱/۹۳ ± ۱/۲۵#	۱/۹۴ ± ۱/۱۱#	۱/۹۵ ± ۰/۴۵#	۱/۹۷ ± ۱/۵۴#	۱/۹۴ ± ۰/۷۸#
	۲۴ساعت	۱/۷۰ ± ۱/۰۲ aψ	۱/۷۲± ۰/۵۹ aψ	۱/۷۹ ± ۱/۱۸ bψ	۱/۸۸ ±۱/۸۱ cψ	۱/۷۱ ±۱/۲۰ aψ
	۷۲ساعت	۱/۱۸±۰/۵۹ aφ	۱/۲۱ ± ۱/۰۱ aφ	۱/۲۵ ±۰/۶۷ bφ	۱/۳۲±۱/۲۷ cφ	۱/۲۲±۰/۴۰ aφ
	۱۲۰ساعت	۰/۷۵ ± ۰/۶۷ aϒ	۰/۷۵± ۰/۹۵ aϒ	۰/۸۹ ±۰/۵۰ bϒ	۰/۹۶±۰/۸۷ cϒ	۰/۷۷±۰/۶۳ aϒ

*حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

*اشکال مختلف (ψ, φ, ϒ ,#) نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵). (داده‌ها به‌صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

عملکرد می‌شود. پراکسیداسیون لیپید غشای سلول و لیپوپروتئین‌های پلاسما اولین رخدادهایی هستند که در شروع تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شوند (۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که تغذیه با دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند بهبود قابل توجهی در کیفیت پارامترهای منی ایجاد کند. به علاوه، تغذیه با دوکوزاهگزانوئیک اسید در قوچها و گوزن‌ها نیز می‌تواند کیفیت منی تازه را افزایش دهد (۲۹، ۶). در برخی مطالعات، استفاده از دوکوزاهگزانوئیک اسید و مشتقات امگا ۳ به‌عنوان درمان کمکی در باروری نرها پیشنهاد شده است (۹). همچنین، در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که مصرف خوراکی دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند بهبود قابل توجهی در کیفیت اسپرم نریان پس از فرایند سرد کردن و انجماد ایجاد کند (۳). در تحقیقات قبلی نیز نشان داده شده است که غنی‌سازی مایع منی با دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند بهبود قابل توجهی در کیفیت مایع منی پس از فرایند انجماد در گاو و اسب ایجاد کند (۱۵، ۲۰).

ارزیابی یکپارچگی و آسیب DNA در اسپرم سرد شده سگ به میزان زیادی مهم است، زیرا شوک سرما می‌تواند بر ساختار کروماتین تأثیر بگذارد و توانایی اسپرم برای تحرک و رشد جنین را کاهش دهد (۱۲). همچنین، این شوک می‌تواند به آکروزوم، قسمت مهمی از اسپرم، آسیب برساند و درنتیجه قدرت باروری اسپرم را کاهش دهد (۴۳). مطالعه حاضر نشان داد که نگهداری منی در دماهای پایین بدون استفاده از دوکوزاهگزانوئیک اسید، منجر به کاهش درصد اسپرم‌های با یکپارچگی DNA می‌شود و از سوی دیگر، غنی‌سازی منی با دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند بهبودی در وضعیت یکپارچگی DNA در اسپرم‌ها ایجاد کند. این مطالعه با سایر تحقیقات قبلی که نشان داده‌اند استفاده از دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌تواند بهبودی در یکپارچگی DNA و غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها پس از فرایند انجماد در گاو ایجاد کند (۱۵). علاوه بر این، مطالعات مشابه نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های غذایی حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید به‌صورت خوراکی می‌تواند بهبودی در یکپارچگی DNA اسپرم در حیوانات پستاندار ایجاد کند (۲۴، ۹). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که استفاده از دوکوزاهگزانوئیک اسید منجر به کاهش تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی DNA در منی گاو می‌شود (۱۸)، اما در مورد گوزن، دوکوزاهگزانوئیک اسید توانسته است بهبودی در یکپارچگی DNA اسپرم و غشاء پلاسمایی منی پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی ایجاد کند (۱۴، ۷).

نتیجه‌گیری

دوکوزاهگزانوئیک اسید به ترتیب در غلظت‌های ۵ و ۲/۵ نانوگرم، توانایی محافظت از اسپرماتوزوآ سگ را در طی نگهداری در دمای یخچال دارد. این توانایی به دلیل کاهش آسیب به اسپرم و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن است. درنتیجه، منی غنی‌شده با دوکوزاهگزانوئیک اسید با غلظت بالاتر و همچنین دوکوزاهگزانوئیک اسید با غلظت کمتر می‌توانند میزان آنتی‌اکسیدان‌ها را در پلاسمای منی و اسپرم افزایش دهند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند تشکر به عمل می آید.

منابع مورد استفاده

1. Aitken, R.J. and Baker, M.A., 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. Molecular and cellular endocrinology, 250(1-2), pp.66-69.

2. Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C., 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 55(3), pp.282-288.

3. Brinsko, S.P., Varner, D.D., Love, C.C., Blanchard, T.L., Day, B.C. and Wilson, M.E., 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutriceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. Theriogenology, 63(5), pp.1519-1527.

4. Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C. and Sirard, M.A., 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56(2), pp.275-286.

5. Cassani, P., Beconi, M.T. and O'Flaherty, C., 2005. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. Animal reproduction science, 86(1-2), pp.163-173.

6. Castellano, C.A., Audet, I., Bailey, J.L., Laforest, J.P. and Matte, J.J., 2010. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 C or cryopreserved. Theriogenology, 74(8), pp.1482-1490.

7. Chanapiwat, P., Kaeoket, K. and Tummaruk, P., 2012. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. African journal of biotechnology, 11(15), pp.3697-3703.

8. Chi, H.J., Kim, J.H., Ryu, C.S., Lee, J.Y., Park, J.S., Chung, D.Y., Choi, S.Y., Kim, M.H., Chun, E.K. and Roh, S.I., 2008. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. Human Reproduction, 23(5), pp.1023-1028.

9. Conquer, J.A., Martin, J.B., Tummon, I., Watson, L. and Tekpetey, F., 2000. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. Lipids, 35, pp.149-154.

10. Cardoso, R.D.C.S., Silva, A.R. and da Silva, L.D.M., 2006. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. Animal reproduction science, 92(3-4), pp.384-391.

11. Dyerberg, J., Leaf, A. and Galli, C., 1995. ISSFAL board state-

human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution at 4 C. Fertility and sterility, 65(6), pp.1214-1218.
32. Salehi, S., Soleimanzadeh, A., Goericke-Pesch, S. and Ayen, E., 2023. Evaluation of the effects of crocin addition on canine semen dilution during refrigerated storage. Iranian Journal of animal Science, 54(3), pp.303-315.
33. Sarıözkan, S., Türk, G., Cantürk, F., Yay, A., Eken, A. and Akçay, A., 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. Cryobiology, 67(1), pp.1-6.
34. Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P.T. and Varalakshmi, P., 2006. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. Toxicology, 217(1), pp.71-78.
35. Shakouri, N., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A. and Bucak, M.N., 2021. Antioxidant effects of supplementation of 3, 4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. Reproduction in Domestic Animals, 56(7), pp.1004-1014.
36. Sheikholeslami, S.A., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A. and Shirani, D., 2020. The evaluation of lycopene and cysteamine supplementation effects on sperm and oxidative stress parameters during chilled storage of canine semen. Reproduction in Domestic Animals, 55(9), pp.1229-1239.
37. Soleimanzadeh, A. and Saberivand, A., 2013. Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. Veterinary Research Forum, 4(3), pp. 185-189
38. Soleimanzadeh, A., Kian, M., Moradi, S. and Mahmoudi, S., 2020. Carob (Ceratonia siliqua L.) fruit hydro-alcoholic extract alleviates reproductive toxicity of lead in male mice: Evidence on sperm parameters, sex hormones, oxidative stress biomarkers and expression of Nrf2 and iNOS. Avicenna journal of phytomedicine, 10(1), pp.35-49.
39. Soleimanzadeh, A., Kian, M., Moradi, S. and Malekifard, F., 2018. Protective effects of hydro-alcoholic extract of Quercus brantii against lead-induced oxidative stress in the reproductive system of male mice. Avicenna Journal of Phytomedicine, 8(5), pp.448-456.
40. Soleimanzadeh, A., Mohammadnejad, L. and Ahmadi, A., 2018. Ameliorative effect of Allium sativum extract on busulfan-induced oxidative stress in mice sperm. Veterinary Research Forum, 9(3), pp. 265-271
41. Soleimanzadeh, A., Pourebrahim, M., Delirezh, N. and Kian, M., 2018. Ginger ameliorates reproductive toxicity of formaldehyde in male mice: Evidences for Bcl-2 and Bax. Journal of Herbmed Pharmacology, 7(4), pp.259-266.
42. Soleimanzadeh, A., Saberivand, A. and Ahmadi, A., 2014. effect of α-tocopherol on spermatozoa of rat semen after the freeze-thawing process. Studies in Medical Sciences, 25(9), pp.826-834.
43. Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal reproduction science, 60, pp.481-492.

ment: Recommendations for the essential fatty acid requirement for infant formulas. J Am Coll Nutr, 14(2), pp.213-214.
12. Hamamah, S., Royère, D., Nicolle, J.C., Paquignon, M. and Lansac, J., 1990. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. Reproduction nutrition development, 30(1), pp.59-64.
13. Izanloo, H., Soleimanzadeh, A., Bucak, M.N., Imani, M. and Zhandi, M., 2021. The effects of varying concentrations of glutathione and trehalose in improving microscopic and oxidative stress parameters in Turkey semen during liquid storage at 5 C. Cryobiology, 101, pp.12-19.
14. Kaeoket, K., Sang-Urai, P., Thamniyom, A., Chanapiwat, P. and Techakumphu, M., 2010. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Reproduction in domestic animals, 45(3), pp.458-463.
15. Kaka, A., Haron, W., Yusoff, R., Yimer, N., Khumran, A.M., Sarsaifi, K., Behan, A.A., Kaka, U., Memon, A.A. and Ebrahimi, M., 2017. Effect of docosahexanoic acid on quality of frozen–thawed bull semen in BioXcell extender. Reproduction, fertility and development, 29(3), pp.490-495.
16. Kedechi, S., Zribi, N., Louati, N., Menif, H., Sellami, A., Lassoued, S., Ben Mansour, R., Keskes, L., Rebai, T. and Chakroun, N., 2017. Antioxidant effect of hydroxytyrosol on human sperm quality during in vitro incubation. Andrologia, 49(1), p.e12595.
17. Kiernan, M., Fahey, A.G. and Fair, S., 2013. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. Reproduction, fertility and development, 25(6), pp.947-954.
18. Kiernan, M., Fahey, A.G. and Fair, S., 2013. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. Reproduction, fertility and development, 25(6), pp.947-954.
19. Linde-Forsberg, C., 1995, February. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. In Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal, 10, pp. 48-48.
20. Losano, J.D., Angrimani, D.S., Rui, B.R., Bicudo, L.C., Dalmazzo, A., Silva, B.C., Viana, C.H., Mendes, C.M., Assumpção, M.E., Barnabe, V.H. and Nichi, M., 2018. The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. Zygote, 26(3), pp.199-206.
21. Martı, J.I., Martı, E., Cebrian-Perez, J.A. and Muino-Blanco, T., 2003. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Theriogenology, 60(6), pp.1025-1037.
22. Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N. and Boscos, C.M., 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Animal reproduction science, 112(1-2), pp.119-135. Nasiri, A.H., Towhidi, A. and Zeinoaldini, S., 2012. Combined effect of DHA and α-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. Andrologia, 44, pp.550-555.
23. Nasiri, A.H., Towhidi, A. and Zeinoaldini, S., 2012. Combined effect of DHA and α-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. Andrologia, 44, pp.550-555.
24. Parthasarathy, S., Santanam, N., Ramachandran, S. and Meilhac, O., 1999. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. Journal of Lipid Research, 40(12), pp.2143-2157.
25. Penny, P.C., Noble, R.C., Maldjian, A. and Cerolini, S., 2000. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. Pig News and Information, 21(4).
26. PERROS, C., 2017. Oxidative stress challenges during the sperm cryopreservation in dogs. J. Vet. Androl, 2, pp.1-7.
27. Ramazani, N., Gharebagh, F.M., Soleimanzadeh, A., Arslan, H.O., Keles, E., Gradinarska-Yanakieva, D.G., Arslan-Acaröz, D., Zhandi, M., Baran, A., Ayen, E. and Dinç, D.A., 2023. Reducing oxidative stress by κ-carrageenan and C60HyFn: The post-thaw quality and antioxidant status of Azari water buffalo bull semen. Cryobiology, 111, pp. 104-112
28. Ramazani, N., Mahd Gharebagh, F., Soleimanzadeh, A., Arslan, H.O., Keles, E., Gradinarska-Yanakieva, D.G., Arslan-Acaröz, D., Zhandi, M., Baran, A., Ayen, E. and Dinç, D.A., 2023. The influence of L-proline and fulvic acid on oxidative stress and semen quality of buffalo bull semen following cryopreservation. Veterinary Medicine and Science, 9(4), pp.1791-1802.
29. Rooke, J.A., Shao, C.C. and Speake, B.K., 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. REPRODUCTION-CAMBRIDGE-, 121(2), pp.315-322.
30. Sabzeie, M.M., Ayen, E., Soleimanzadeh, A. and Bucak, M.N., 2023. Tribulus terrestris aqueous extract supplementation effects on sperm characteristics and anti-oxidant status during chilled storage of canine semen. Veterinary Research Forum, 14(2), pp. 71-77
31. Saito, K., Kinoshita, Y., Kanno, H. and Iwasaki, A., 1996. The role of potassium ion and extracellular alkalization in reinitiation of